

JP, 11-332567 (07.12.99)

TITLE: Method for determining one's atopic constitution

Provides a method for assessing one's risk for atopic disease by determining individual's specific gene sequence.

Polymorphism of the gene for Interleukin-4 receptor alpha is used to assess one's atopic constitution. A DNA fragment containing partial or full sequence of the gene coding for Interleukin-4 receptor alpha chain is amplified from individuals genomic DNA, by polymerase chain reaction. The individual's DNA sequence coding for the receptor is determined by sequencing the amplified fragment. The risk for atopic disease is judged as higher in those who has the DNA sequence for isoleucine in the 50<sup>th</sup> amino acid from the receptor's N-terminus.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-332567

(43) 公開日 平成11年(1999)12月7日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	F I	
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A
A 6 1 K 38/00		A 6 1 K 39/395	A B F N
39/395	A B F	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 P 21/08		C 1 2 Q 1/68	Z
C 1 2 Q 1/68		G 0 1 N 33/53	Q
審査請求 未請求 請求項の数21 O L (全 11 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願平10-140703

(22) 出願日 平成10年(1998) 5月22日

(71) 出願人 000002831

第一製薬株式会社

東京都中央区日本橋3丁目14番10号

(72) 発明者 出原 賢治

福岡県福岡市南区長住4-9-4

(72) 発明者 浜崎 直孝

福岡県福岡市城南区東油山1-23-3

(74) 代理人 弁理士 今村 正純 (外1名)

(54) 【発明の名称】 アトピー体質の判定方法

(57) 【要約】

【課題】 遺伝子工学の手法を用いて、個体の特定の遺伝子配列からアトピー性アレルギー疾患の発症危険性を正確に判定する方法を提供する。

【解決手段】 アトピー体質を判定する方法であって、インターロイキン4受容体 $\alpha$ 鎖をコードする遺伝子の核酸部分塩基配列又は全長を含むフラグメントをPCR法により増幅する工程などにより、N末端から50番目のアミノ酸がイソロイシンであるインターロイキン4受容体 $\alpha$ 鎖を有する個体をアトピー性アレルギー疾患の発症危険性ありと判定する方法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 アトピー性アレルギー疾患を判定する方法であって、N末端から50番目のアミノ酸がイソロイシンであるインターロイキン4受容体 $\alpha$ 鎖を有する個体をアトピー性アレルギー疾患の発症危険性ありと判定する方法。

【請求項2】 インターロイキン4受容体 $\alpha$ 鎖をコードする遺伝子の核酸配列を決定することにより判定を行う請求項1記載の方法。

【請求項3】 インターロイキン4受容体 $\alpha$ 鎖をコードする遺伝子の核酸部分塩基配列又は全長を含むフラグメントをPCR法により増幅する工程を含む請求項1記載の方法。

【請求項4】 インターロイキン4受容体 $\alpha$ 鎖をコードする遺伝子においてインターロイキン4受容体 $\alpha$ 鎖のN末端から50番目のアミノ酸をコードする核酸配列がイソロイシンをコードする核酸配列である場合に、その個体をアトピー性アレルギー疾患の発症危険性ありと判定する請求項2又は3記載の方法。

【請求項5】 インターロイキン4受容体遺伝子の両方の対立遺伝子においてインターロイキン4受容体 $\alpha$ 鎖のN末端から50番目のアミノ酸をコードする核酸配列がイソロイシンをコードする核酸配列である場合に、その個体をアトピー性アレルギー疾患の発症危険性が高いと判定する請求項4記載の方法。

【請求項6】 アトピー性アレルギー疾患の発症危険性を判定する方法であって、下記の工程：

(a) 個体より分離した生体試料を用いてインターロイキン4受容体 $\alpha$ 鎖をコードする遺伝子の核酸番号150から152を含む部分塩基配列又は全長を含むフラグメントをPCR法により増幅する工程；

(b) Ile50Val変異を含むフラグメントが得られた場合には、その個体をアトピー性アレルギー疾患の発症危険性ありと判定する工程、を含む方法。

【請求項7】 下記のプライマー・セット：

Aプライマー：5'-CGGAATTCCGAGGCC  
CACACGTTGT

Bプライマー：5'-CGCTGGGCTTGAAGG  
AGを用いる請求項3ないし6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項8】 アトピー性アレルギー疾患の発症危険性を判定するために用いるプライマー・セットであって、請求項7に記載のAプライマー及びBプライマーを含むセット。

【請求項9】 N末端から50番目のアミノ酸がイソロイシンであるインターロイキン4受容体 $\alpha$ 鎖を特異的に認識するモノクローナル抗体を用いて判定を行う請求項1記載の方法。

【請求項10】 N末端から50番目のアミノ酸がイソロイシンであるインターロイキン4受容体 $\alpha$ 鎖を含むインターロイキン受容体にアンタゴニストとして結合するリ

(2)

ガンドを含むアトピー性アレルギー疾患の治療及び／又は予防剤。

【請求項11】 インターロイキン受容体がインターロイキン4受容体である請求項10記載の治療及び／又は予防剤。

【請求項12】 N末端から50番目のアミノ酸がイソロイシンであるインターロイキン4受容体 $\alpha$ 鎖を含むインターロイキン受容体にアンタゴニストとして結合するリガンドを評価する工程を含む、アトピー性アレルギー疾患の治療及び／又は予防剤の評価方法。

【請求項13】 インターロイキン受容体がインターロイキン4受容体である請求項12記載の治療及び／又は予防剤の評価方法。

【請求項14】 N末端から50番目のアミノ酸がイソロイシンであるインターロイキン4受容体 $\alpha$ 鎖を含むインターロイキン受容体を不活性化する物質を有効成分として含む、アトピー性アレルギー疾患の治療及び／又は予防剤。

【請求項15】 インターロイキン受容体がインターロイキン4受容体である請求項14記載の治療及び／又は予防剤。

【請求項16】 インターロイキン受容体を不活性化又は阻害する物質が、モノクローナル抗体又はそのモノクローナル抗体の抗原認識部位を有する物質である、請求項14又は15記載の治療及び／又は予防剤。

【請求項17】 N末端から50番目のアミノ酸がイソロイシンであるインターロイキン4受容体の $\alpha$ 鎖を含むインターロイキン受容体から引き起こされるIgEの生産増加の阻害剤又は抑制剤。

【請求項18】 N末端から50番目のアミノ酸がイソロイシンであるインターロイキン4受容体の $\alpha$ 鎖を含むインターロイキン受容体から引き起こされるスタット6のリン酸化の阻害剤又は抑制剤。

【請求項19】 アトピー性アレルギー疾患がアトピー性皮膚炎、アトピー性喘息又は花粉症である請求項1ないし6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項20】 アトピー性アレルギー疾患がアトピー性皮膚炎、アトピー性喘息又は花粉症である請求項10、請求項11、請求項14ないし16のいずれか1項に記載の方法。

【請求項21】 アトピー性アレルギー疾患がアトピー性皮膚炎、アトピー性喘息又は花粉症である請求項12又は13記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】本発明は、アトピー性アレルギー疾患の発症の危険性を判定する方法に関する。より具体的には、個体の特定の遺伝子配列から遺伝子工学の手法を用いてアトピー性アレルギー疾患の発症危険性を正確に判定する方法に関するものである。

【0002】喘息は日常生活に支障をもたらす疾病であ

り、小児や若年成人におけるその主因はアトピーである。アトピーにはヘルパーT細胞タイプ2サブタイプが関与しており、特にインターロイキン(I L-4)が過剰でダニや花粉などの環境に存在する抗原に対するI g Eが産生されている免疫不全である(Shirakawa, T. et al., Science, 275, pp. 77-79, 1997)。気道の肥満細胞に結合したI g Eと抗原との反応は粘膜の炎症を誘起し、これが喘息症状を引き起こす。アトピーの発症に遺伝的要因が関与する可能性は、臨床の場において経験的に認められている。しかしながら、アトピーは遺伝的要因に環境的要因が加わって発症する多因子遺伝疾患であるため、その原因遺伝子の同定は非常に困難であった。

【0003】遺伝学的なアプローチである染色体を対象とした連鎖解析により、血清I g E値と第5、6、7、11、および16染色体との関連が示されている。これらの染色体には、I L-4などの種々のサイトカイン、HLA、T細胞受容体、高親和性I g E受容体、およびI L-4受容体など多様な遺伝子が存在しており、これらの遺伝子がアレルギー、特にアトピー関連遺伝子の候補として考えられている。広範な一連の研究の結果、遺伝学的には2種以上の遺伝子がアトピーに関与していることが判明したが

(Daniels, S.E., et al., Nature, 383, pp. 247-250, 1996; Nature Genet., 15, pp. 389-392, 1997)、これらの遺伝子がどのような機構でアトピーの遺伝的体質に関与するのかなどの機能面での証明は皆無であり、あくまで原因遺伝子としての候補の域を脱していなかった。

【0004】I L-4やインターロイキン13(I L-13)は、B細胞におけるI g E産生やヘルパーT細胞のTh2サブタイプへの分化に必須のサイトカインであり、I g E依存性であるアレルギー疾患の病態進展に深く関連している。特に、I L-4は多機能造血性サイトカインであり、B細胞がI g E抗体を産生するのに必須であると共に、ヘルパーT細胞がTh2(ヘルパーT細胞タイプ2)へと成熟化するのにも不可欠であるところから(Zurowski, G. et al., Immunology Today, 15, pp. 19-26, 1994)、I g E-依存性アトピー障害において決定的な役割を果たしていると考えられる。

【0005】I L-4やI L-13がI g E産生やヘルパーT細胞のTh2サブタイプへの分化誘導を惹起するには、Signal Transducer and Transcription factor-6 (STAT 6: 以下、「スタット6」と略す場合がある)と呼ばれる転写因子が細胞内情報伝達系において重要な役割を果たしている。I L-4は、I L-4受容体 $\alpha$ 鎖とインターロイキン2受容体 $\gamma$ 鎖(共通 $\gamma$ 鎖: Russel, S.M. et al., Science, 262, pp. 1880-1882, 1993)とからなる特異的な受容体複合体を介して作用する。I L-4受容体 $\alpha$ 鎖にはヤヌスカイネース(Janus kinase)であるJAK1が会合し、共通 $\gamma$ 鎖にはJAK3が会合して、これらのチロシンリン酸化酵素がスタット6を活性化する。

【0006】最近、I L-4受容体 $\alpha$ 鎖のバリエーションで

あるArg576Gln(アミノ酸番号は1番目のATGコドンからの番号を示し、数字の右側に示した天然型アミノ酸が数字左側に示したアミノ酸に変異したことを示す)が他のアトピー関連障害[過I g E症候群及び重症湿疹]と関連付けられて、負の調節分子であるSHP-1が受容体に結合するのを妨げることが示された(Khurana, G.K., et al., New. Engl. J. M., 337, pp. 1720-1725, 1997)。

【0007】一方、ヒトI L-4受容体 $\alpha$ 鎖のI le50Val変異も同定されている(50は2番目のATGコドンからの番号である)(Idzerda, R.L., J. Exp. Med., 171, pp. 861-873, 1990; Garizzi, J.-P. et al., Int. Immunol., 2, pp. 669-675, 1990)。これは、ヒトI L-4受容体 $\alpha$ の細胞外交異で今日までに知られている唯一のものである(Deichmann, K. et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 231, pp. 696-697, 1997)。しかしながら、このヒトI L-4受容体 $\alpha$ 鎖のアミノ酸変異とアトピーとの関連については従来報告がない。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】本発明の課題は、アトピー性アレルギー疾患の発症の危険性を正確に判定する方法を提供することにある。より具体的には、遺伝子工学の手法を用いて、個体の特定の遺伝子配列からアトピー性アレルギー疾患の発症危険性を正確に判定する方法を提供することが本発明の課題である。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明者らはヒトI L-4受容体 $\alpha$ 鎖の遺伝子変異とアトピー性アレルギー疾患発症との相関を解明すべく、アトピー性及び非アトピー性の喘息について大規模な遺伝子連鎖解析を行い、見出された変異型I L-4受容体 $\alpha$ 鎖遺伝子をマウス及びヒトのB細胞系にトランスフェクションを行った後、機能検定を行った。その結果、I L-4受容体 $\alpha$ 鎖のI le50Val変異が喘息の発症に強く関与していることを見出した。本発明は上記の知見を元にして完成されたものである。

【0010】すなわち本発明は、アトピー性アレルギー疾患発症の危険性を判定する方法であって、N末端から50番目のアミノ酸がイソロイシンであるI L-4受容体 $\alpha$ 鎖を有するヒト個体をアトピー性アレルギー疾患の発症危険性ありと判定する方法を提供するものである。この発明の好ましい態様によれば、I L-4受容体 $\alpha$ 鎖をコードする遺伝子の核酸配列を決定することにより判定を行う上記方法; 及び、I L-4受容体 $\alpha$ 鎖をコードする遺伝子の部分塩基配列又は全長を含むフラグメントをPCR法により増幅する工程を含む上記方法が提供される。

【0011】別の好ましい態様によれば、I L-4受容体 $\alpha$ 鎖をコードする遺伝子においてI L-4受容体 $\alpha$ 鎖のN末端から50番目のアミノ酸をコードする核酸配列が

イソロイシンをコードする核酸配列である場合に、その個体をアトピー性アレルギー疾患の発症危険性ありと判定する上記方法；インターロイキン4受容体遺伝子の両方の対立遺伝子のうち少なくとも一方の遺伝子においてIL-4受容体 $\alpha$ 鎖のN末端から50番目のアミノ酸をコードする核酸配列がイソロイシンをコードする核酸配列である場合に、その個体をアトピー性アレルギー疾患の発症危険性が高いと判定する上記方法；及び、インターロイキン4受容体遺伝子の両方の対立遺伝子においてIL-4受容体 $\alpha$ 鎖のN末端から50番目のアミノ酸をコードする核酸配列がイソロイシンをコードする核酸配列である場合に、その個体をアトピー性アレルギー疾患の発症危険性が高いと判定する上記方法が提供される。

【0012】別の観点からは、アトピー性アレルギー疾患発症の危険性を判定する方法であって、下記の工程：(a) ヒト個体より分離した生体試料を用いてIL-4受容体 $\alpha$ 鎖をコードする遺伝子の核酸番号150から152を含む部分塩基配列又は全長を含むフラグメントをPCR法により増幅する工程；及び(b) Ile50Val変異を含むフラグメントが得られた場合にはその個体をアトピー性アレルギー疾患の発症危険性ありと判定する工程を含む方法；下記のプライマー・セット：Aプライマー：5'-CGGAATTCCGAGGCCACACGTTGT、及びBプライマー：5'-CGCTGGGCTTGAAGGAGを用いる上記方法；及びN末端から50番目のアミノ酸がイソロイシンであるIL-4受容体 $\alpha$ 鎖を特異的に認識するモノクローナル抗体を用いて判定を行う上記方法が提供される。

【0013】さらに別の観点からは、N末端から50番目のアミノ酸がイソロイシンであるIL-4受容体 $\alpha$ 鎖を含むインターロイキン受容体（好ましくはIL-4受容体又はIL-13受容体、より好ましくはIL-4受容体）にアンタゴニストとして結合するリガンドを含むアトピー性アレルギー疾患の治療及び／又は予防剤；N末端から50番目のアミノ酸がイソロイシンであるIL-4受容体 $\alpha$ 鎖を含むインターロイキン受容体（好ましくはIL-4受容体又はIL-13受容体、より好ましくはIL-4受容体）にアンタゴニストとして結合するリガンドを評価する工程を含む、アトピー性アレルギー疾患の治療及び／又は予防剤の評価方法が提供される。

【0014】また、別の観点からは、N末端から50番目のアミノ酸がイソロイシンであるIL-4受容体 $\alpha$ 鎖を含むインターロイキン受容体（好ましくはIL-4受容体又はIL-13受容体、より好ましくはIL-4受容体）を不活性化又は阻害する物質、好ましくはモノクローナル抗体を有効成分として含む、アトピー性アレルギー疾患の治療及び／又は予防剤が提供される。

【0015】さらに、別の観点からは、N末端から50番目のアミノ酸がイソロイシンであるインターロイキン4受容体の $\alpha$ 鎖を有するインターロイキン受容体から引き

起こされるIgEの生産増加の阻害剤又は抑制剤；N末端から50番目のアミノ酸がイソロイシンであるインターロイキン4受容体の $\alpha$ 鎖を有するインターロイキン受容体から引き起こされるスタット6のリン酸化の阻害剤又は抑制剤が提供される。これらの発明において、アトピー性アレルギー疾患の好ましい例としては、アトピー性皮膚炎、アトピー性喘息、又は花粉症を挙げることができる。

#### 【0016】

10 【発明の実施の形態】本発明の方法は、アトピー性アレルギー疾患発症の危険性を判定するにあたり、N末端から50番目のアミノ酸がイソロイシンであるIL-4受容体 $\alpha$ 鎖を有する個体をアトピー性アレルギー疾患の発症危険性ありと判定することを特徴としている。ヒトIL-4受容体 $\alpha$ 鎖のアミノ酸配列及びIle50Val変異については公知文献に記載されている(Idzerda, R. L., J. Exp. Med., 171, pp.861-873, 1990; Garizzi, J.-P. et al., Int. Immunol., 2, pp.669-675, 1990)。

20 【0017】本発明の方法では、判定を行うにあたり、個体から分離・採取された生体試料を用いて、その個体が有するIL-4受容体のIL-4受容体 $\alpha$ 鎖にIle50Val変異が含まれるか否かを確認する。この確認のための手段は特に限定されず、IL-4受容体 $\alpha$ 鎖を構成するポリペプチド鎖のアミノ酸配列を直接分析する方法のほか、遺伝子工学的な手法に従って、インターロイキン4受容体 $\alpha$ 鎖をコードする遺伝子の核酸配列を決定する方法などを採用することができる。生体試料の種類は特に限定されないが、例えば、血液、組織片などを用いることが好ましい。

30 【0018】IL-4受容体 $\alpha$ 鎖をコードする遺伝子の核酸配列を決定する方法としては、PCR（ポリメラーゼ・チェーン・リアクション）法を採用することが好ましい。この方法は遺伝子工学の分野で周知かつ汎用されており、適宜のプライマー配列を用いることにより、目的の遺伝子フラグメントを短時間に簡便に増幅することができる。PCR法により、IL-4受容体 $\alpha$ 鎖をコードする遺伝子の部分塩基配列であって、該遺伝子の核酸番号150から152を含む部分塩基配列（IL-4受容体 $\alpha$ 鎖のN末端アミノ酸をコードする核酸を核酸番号1から3とする）、又はIL-4受容体 $\alpha$ 鎖をコードする遺伝子の全長を含むフラグメントを増幅することができる。

40 【0019】PCR法の反応条件、試薬などは当業者に適宜選択可能であり、プライマー配列も所望のフラグメントを効率的に増幅できるように適宜設計して用いることができる。例えば、下記のプライマー・セット：Aプライマー：5'-CGGAATTCCGAGGCCACACGTTGT、及びBプライマー：5'-CGCTGGCTTGAAGGAGを用いると、効率的に所望の

フラグメントを調整することが可能である。増幅されたフラグメントの核酸配列を決定する方法も特に限定されず、当業者に利用可能な種々の方法のうちいかなるものを採用してもよい。

【0020】本発明の判定方法に従えば、IL-4受容体 $\alpha$ 鎖をコードする遺伝子においてIL-4受容体 $\alpha$ 鎖のN末端から50番目のアミノ酸をコードする核酸配列がイソロイシンをコードする核酸配列である場合に、そのヒト個体、好ましくはヒト小児個体はアトピー性アレルギー疾患の発症危険性ありと判定される。このような個体には、Ile50ホモ及びヘテロが含まれる。これらのうち、少なくとも一方の対立遺伝子においてIL-4受容体 $\alpha$ 鎖のN末端から50番目のアミノ酸をコードする核酸配列がイソロイシンをコードする核酸配列である場合(Ile50ヘテロ)には、その個体はIle50を含まない個体に比べてアトピー性アレルギー疾患の発症危険性が高いと判定できる。また、両方の対立遺伝子においてIL-4受容体 $\alpha$ 鎖のN末端から50番目のアミノ酸をコードする核酸配列がイソロイシンをコードする核酸配列である場合(Ile50ホモ)には、その個体はIle50ヘテロの個体よりもアトピー性アレルギー疾患の発症危険性がさらに高いと判定される。

【0021】本発明の方法は、一般的には、下記の2工程：(a) ヒト個体より分離した生体試料を用いてIL-4受容体 $\alpha$ 鎖をコードする遺伝子の核酸番号150から152を含む部分塩基配列又は全長を含むフラグメントをPCR法により増幅する工程；及び(b) Ile50Val変異を含むフラグメントが得られた場合にはその個体をアトピー性アレルギー疾患の発症危険性ありと判定する工程を含む方法により実施されることが好ましい。

【0022】別の観点からは、N末端から50番目のアミノ酸がイソロイシンであるIL-4受容体 $\alpha$ 鎖を含むIL-4受容体又はIL-13受容体にアンタゴニストとして結合するリガンドを有効成分として含むアトピー性アレルギー疾患の治療及び／又は予防剤が提供される。ある物質がアンタゴニストとしてIL-4受容体 $\alpha$ 鎖を含むIL-4受容体に結合可能か否かは、結合定数(受容体親和性)やインターロイキン4の生理活性発現阻害

濃度などを調べることにより容易に判定できる。本発明のアトピー性アレルギー疾患の治療及び／又は予防剤の評価方法は、種々の化合物のなかから、上記の特徴を有するリガンドを評価により選択することの特徴としている。候補物質を選別するための指標としては、例えば、上記に説明した結合定数やIL-4阻害濃度などを用いることができる。

【0023】また、N末端から50番目のアミノ酸がイソロイシンであるIL-4受容体 $\alpha$ 鎖を含むIL-4受容体を不活化する物質、例えば、N末端から50番目のアミノ酸がイソロイシンであるIL-4受容体 $\alpha$ 鎖を特異的に認識するモノクローナル抗体を有効成分として含む医薬もアトピー性アレルギー疾患の治療及び／又は予防剤として有用である。モノクローナル抗体の製造方法は当業者に周知かつ慣用であり、N末端から50番目のアミノ酸がイソロイシンであるIL-4受容体 $\alpha$ 鎖を抗原として用いることにより、上記の特徴を有するモノクローナル抗体を製造することができる。なお、IL-4受容体 $\alpha$ 鎖のIle50Val変異を特異的に認識できるモノクローナル抗体は、本発明の判定方法にも好適に用いることができる。

【0024】

【実施例】以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は下記の実施例に限定されることはない。

#### 例1

母集団の推計学的解析において、Ile50Val変異の試験は、PCRに基づいたMslI制限アッセイを用いて行った。コントロール被験者におけるIL-4受容体 $\alpha$  Ile50及びVal50に対するゲノタイプ頻度はハーディーワインバーグ平衡と合致しており、 $p$ (Ile50) = 0.4、 $q$ (Val50) = 0.6であった。コントロール群とアトピー患者群の間でIle50及びVal50のゲノタイプ頻度は顕著に異っていた(表1)。

【0025】

【表1】

フェノタイプ	Ile50/Ile50	Ile50/Val50	Val50/val50
コントロール	18	46	36
喘息患者			
アトピー成人	59	27	14
アトピー小児	60	28	14
非アトピー成人	16	50	34
低総 IgE (<400 U/ml)	35	87	68
高総 IgE (>400 U/ml)	119	65	34
ダニ抗原陰性	34	92	64
ダニ抗原陽性	119	59	32

【0026】Ile50はアトピー性喘息に関連していたが、内因性喘息や非アトピー性喘息には関連がなかった。Ile50は、総血清IgEレベルの上昇（予測比=3.94、95%CI 1.90-5.88、 $p<0.01$ ）とダニ特異性IgEの上昇（予測比=3.18、95%CI 1.72-2.28、 $p<0.01$ ）にも関連していた。アトピー性喘息との関連は、特に小児において強かった（予測比=6.30、95%CI 3.66-8.95、 $p<0.001$ ）；成人（予測比=3.67、95%CI 1.57-6.69、 $p<0.01$ ）。これらの結果は、若年の一卵性双生児が喘息症状と総血清IgEレベルとの間に最も高い対応率を示したことと一致しており、かつアトピーや喘息に対する相対的な遺伝的インプットまたは遺伝性が小児において最大であるという結論とも一致する(Shirakawa, T., et al., J. Clin. Epidemiol., 49, pp.1059-1065, 1996)。

【0027】小児喘息群におけるIle50ホモ接合体の高い頻度[~60%]は、アトピーに関するIle50の主として劣性の遺伝的効果を示唆しており、一方、Arg576Glnの効果は主として優性であるように見受けられた(Khurama, G. K., New Engl. J. M., 337, p.1720-1725, 1997)。この結果は、異質性が一つの座の中だけでなく異なった座の間でも見られるというアトピーの遺伝学の複雑さを示している。

【0028】IL-4受容体 $\alpha$ のIle50変異とVal50変異の機能を調べるために、これらの変異を示すcDNAを用いて、ルシフェラーゼまたはヒト成長ホルモン遺伝子のいずれかに結合させたヒトIL-4遺伝子のプロモーター領域を含むプラスミドを構築し、マウスBリンパ球又はヒトBリンパ球にトランスフェクトした。このIL-4受容体 $\alpha$ 構築物をマウスのpro-B細胞系であるBa/F3 [BF-GETP]にトランスフェクトし、IL-4-ヒト成長ホルモン構築物をヒトB細胞系であるJijoye [J-GETP]にトランスフェクトした。次いで、これらの系のクローンに発現ベクタ

（Ile50またはVal50 IL-4受容体 $\alpha$  cDNA（図1(b)）のいずれかを担持）をトランスフェクトした。

【0029】マウスBF-GETP系をスクリーニングに付すと、10種のIle50の内4種、10種のVal50のうち2種のトランスフェクトされたクローンがヒトIL-4の刺激を受けて良く生育した。Ile50 BF-GETPは、ヒトIL-4の刺激を受けて生育したVal50 BF-GETPに比べてほぼ3倍量の生育を示した（図2）。それらのルシフェラーゼ活性は、マウスIL-4の刺激に対しては互いに異ならず、また親BF-GETPクローンとも異ならなかったが、これは、ジャームラインイブシロン転写物の転写に対する細胞内機構がIle50BF-GETP及びVal50BF-GETPの両者において正常であることを示している。Ile50BF-GETPは、Val50クローンと比較した場合、ヒトIL-4に呼応したIL-4転写物の誘導が約3倍大きかった（それぞれ5.4倍増および15.5倍増）（図3）。

【0030】Val50トランスフェクト物よりもIle50の発現が高いためにヒトIL-4の刺激に対してIle50BF-GETPの応答が増強されている可能性を評価するために、結合アッセイを行った。その結果、平均Kd [52 (39-63) pM対56 (40, 71) pM-図4]におけるIle50BF-GETPとVal50BF-GETPの間には差異がなかった。細胞上のIle50IL-4受容体 $\alpha$ の平均数(2300部位/細胞)はVal50IL-4受容体 $\alpha$ の平均数(2300部位/細胞)と同じであった。この結果は、Ile50がヒトIL-4受容体 $\alpha$ の機能をアップレギュレートし、その結果としてヒトIL-4に呼応した細胞増殖の増加とジャームラインイブシロン転写物(IL-4により支配されている領域のこと)の増加の両方をもたらすことを強く示唆している。

【0031】トランスフェクトされたヒトJ-GETPクローンにおいても同じ結果が得られた。スクリーニン

グの際、10個の薬剤耐性クローンを得たが、これらはそれぞれIle50 IL-4受容体 $\alpha$ またはVal50 IL-4受容体 $\alpha$ を有していた。これらのなかから応答性の高いクローンを3個選んで以下の試験に使用した。

Ile50 J-GETPは、IL-4に応答してVal50 J-GETPが産生したよりも約3倍多い成長ホルモンを産生した(図5)。平均Kd {63-143対100-143 pM} については、Ile50 J-GETPとVal50 J-GETPの間には差異がなく

(図6)、またJ-GETP上のIL-4受容体 $\alpha$ の数においても差はなかった[Ile50では1000-10000/細胞に対しVal50では3600-4200/細胞]。

【0032】Stat6欠損マウスではIgEが産生されないことから(Takeda, K. et al., Nature, 380, pp. 627-630, 1996; Shimoda, K., et al., Nature, 380, p. 630-633, 1996)、上記の知見を明確にし、さらに発展させるために、転写因子Stat6の相対的活性化を検討した。Ile50及びVal50 J-GETPにおけるStat6の活性化の動的パターンはほぼ同等であったが、マウスBF-GETP及びヒトJ-GETPクローンの両者において、Val50と比較してIle50変異体はStat6の活性化を約2倍増強していた(図7:細胞は各ヒトIL-4濃度で15分間インキュベートした)。

【0033】マウスとヒトの両細胞系から得られたデータは、IL-4受容体 $\alpha$ のIle50がIL-4に対する受容体の応答を顕著に増加させ、その結果、Stat6の活性を増加させて、増殖とジャームライン産生をもたらすという結論を強く示唆している。これらの知見は、Ile50とIgEの高い血清レベルとの間に見いだした強い関連性(両方ともトータル且つアレルギー特異性)と完全に一致しており、また統計解析におけるアトピー性喘息とも完全に一致している。なお、IL-4受容体 $\alpha$ はIL-4受容体及びIL-13受容体の両者に共通の成分であるところから(Callard, R.E., Immuno Today, 17, pp. 108-110, 1996)、IL-13はIL-4の多様な機能の一部を共有している。従って、IL-4受容体 $\alpha$ 鎖の変異は、IL-13の機能を増強する可能性がある。

#### 【0034】[実験方法]

##### 被験者の選定

医学検査会社における患者の中からコントロールとして120名の被験者を選定した。選定した被験者の性別と年齢による罹病率はこの地域でのものに合致させた。医師によってアレルギー、内因性小児アレルギー性喘息と診断された120症例を2病院からそれぞれ集めた。被験者は以下の呼吸器症状のうちの2以上を呈した場合に喘息と判定した。(i) 咳、(ii) 痰、(iii) 呼吸困難、(iv) 一日中あるいは夜間のぜい鳴、または

(v) 2年以上にわたるぜい鳴を伴った欠乏呼吸の発作。成人被験者にはヘビースモーカー(紙巻きタバコ20本超/日)はいなかった。

##### 【0035】血清学的試験

MAST(日立製作所)を用いて特異的IgEを検出し、文献記載の方法と同様にして陽性タイターに対するカットオフ値を用いた(Mao, X.-Q. et al., Lancet, 348, pp. 581-583, 1996)。文献記載の小児に対する正常値より大きいあるいは成人では400 kU/L(平均+/-2SD)より大きいものを、高い総IgE値(CAP, Uppsala, スウェーデン)とした。アトピーはIgE応答性で定義し、総血清IgEの高濃度値として、あるいは15種の高度に精製した空媒アレルゲン的一种以上に対する陽性特異性IgEタイターか、これら2つの組合せて診断を下した。

##### 【0036】DNA法

DNAサンプルは市販キット(IsoQuick, Microprobe Corporation, 米国ガーデングローブ)を用いて抽出した。ヒトIL-4受容体 $\alpha$ に対してはゲノミックDNAでなくcDNA配列のみしか入手できなかったため、マウスIL-4受容体 $\alpha$ 遺伝子のエクソン-イントロン構造に基づいて次のプライマーを用いた(Wrighton, N. et al., Growth Factor, 6, pp. 103-118, 1992)。最初94℃で5分間変性させた後、100 ngのゲノミックDNAをテンプレートとして全30  $\mu$ lの反応液中でPCR反応を行い、94℃で30秒、60℃で30秒、さらに72℃で30秒のサイクルを37サイクル実施した。プライマーとして、5'-CGGAATTCGAGGCCACACGTTGT及び5'-CGCTGGGCTTGAAGGAGを用いた。アンダーラインを付した配列は、PCR産物の延長のために加えた。2ユニットのMslI(New England Biolab, 英国)で一夜消化した後、5%アガロースゲルでDNAを分離した(2:3 Nusieve GTG:アガロース)。

##### 【0037】機能アッセイ

文献記載の方法に従って部位特異的突然変異誘発を実施した(Kunkel, T.A., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82, pp. 488-492, 1985)。5' CTCAGGGATAC ACCCGで表されるオリゴヌクレオチドを突然変異誘発に用いた。バリンまたはイソロイシンを担持するヒトIL-4受容体 $\alpha$ のプラスミドDNAをp cDNA3.1/Zeoベクター(Invitrogen, カナダ国カールスバッド)に挿入し、これらをそれぞれVal50及びIle50と命名した。

##### 【0038】トランスフェクトB細胞系の構築

pGL3エンハンサーベクター(プロメガ社、ウィスコンシン州マジソン)に挿入したヒトIle-187~+6のプロモーター領域を含むプラスミドとpSV2ネオマイシン耐性遺伝子とをマウスpro-B細胞系である



Ba/F3に共トランスフェクトし、得られた形質転換細胞をBF-GETPと命名した。Val50IL-4受容体 $\alpha$ またはIle50IL-4受容体 $\alpha$ のいずれかを電気穿孔法によってBF-GETPにトランスフェクトした。

【0039】ヒト成長ホルモンcDNA及びヒトI $\epsilon$ の-583~-3のプロモーター領域を挿入したpS72ベクターのプラスミドでヒトパーキットリンパ腫瘍細胞系であるJijoyeをトランスフェクトした。この形質転換細胞はJan E. de Vries博士(DNAXリサーチ・インスティテュート、カリフォルニア州パロアルト)から寄贈されたものであり、J-GETPと称する。Val50またはIle50IL-4受容体 $\alpha$ のいずれかを電気穿孔法によってJ-GETPにトランスフェクトした。

【0040】BT-GETPを用いたMTTアッセイ  
各種濃度のヒトIL-4で24時間インキュベートした細胞の増殖応答を従前記載のMTT法によって検定した(Yokota, T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81, pp. 1070-1074, 1984)。

BT-GETPを用いたルシフェラーゼ活性アッセイ  
2 ng/mlのヒトIL-4またはマウスIL-4の存在下あるいは不存在下で $1 \times 10^6$ 個の細胞(BT-GETP)を24時間培養後、細胞をリポーター溶解バッファー(プロメガ社)で溶解させ、清澄な細胞溶解液をルシフェラーゼアッセイ試薬(東洋インキ)と混合した。

【0041】成長ホルモンアッセイ  
各種濃度のヒトIL-4で $1 \times 10^4$ 個の細胞を48時間培養後、ELISAアッセイによって成長ホルモンの30産生を調べた。

#### 結合アッセイ

$^{125}$ I-標識ヒトIL-4(NEN、マサチューセッツ州ボストン)の細胞に対する結合アッセイを文献記載の方法に従って行った(Izuhara, K. et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 190, pp. 992-1000, 1993)。

【0042】電気泳動移動度シフトアッセイ(EMS

#### A)

文献記載の方法に従ってEMSAの操作を実施した(Izuhara, K. et al., J. Biol. Chem., 271, pp. 619-622, 1996)。ヒトIL-4によって刺激された細胞を溶解し、核タンパクを抽出した。用いた核抽出物の量は混合前に標準化した。核抽出物を結合バッファーであるpoly(dI-dC)及びI $\epsilon$ の $^{32}$ P標識オリゴヌクレオチドプローブ(5' GTCAACTTCCCAAGAACAGAA)と混合した後、混合物をポリアクリルアミドゲルで電気泳動により分離した。DNA-タンパク複合体をオートラジオグラフィーで視覚化した。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】 インターロイキン4受容体 $\alpha$ 鎖の構造を示す図である。図中、(a)ヒトIL-4受容体 $\alpha$ 鎖の構造の模式図であり、斜線部分はシグナルペプチド、黒く塗った部分はトランスメンブレンドメインを示す。(b)はIle50またはVal50をコードするcDNA配列を示す。

【図2】 Ba/F3トランスフェクタントアッセイ(MTTアッセイ)の結果を示す図である。

【図3】 Ba/F3トランスフェクタントアッセイ(ルシフェラーゼ活性アッセイ)の結果を示す図である。図中、ヒトIL-4の刺激が無い場合の各クローンのルシフェラーゼ活性を1倍として結果を示した。

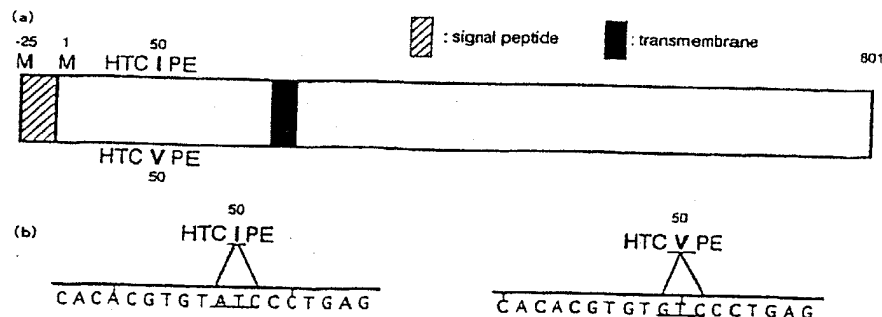
【図4】 Ba/F3トランスフェクタントアッセイ(結合アッセイ)の結果を示す図である。

【図5】 Jijoyeトランスフェクタントアッセイ(成長ホルモン活性アッセイ)の結果を示す図である。誤差を示す縦棒はそれぞれ3クローンでの偏差を示す。

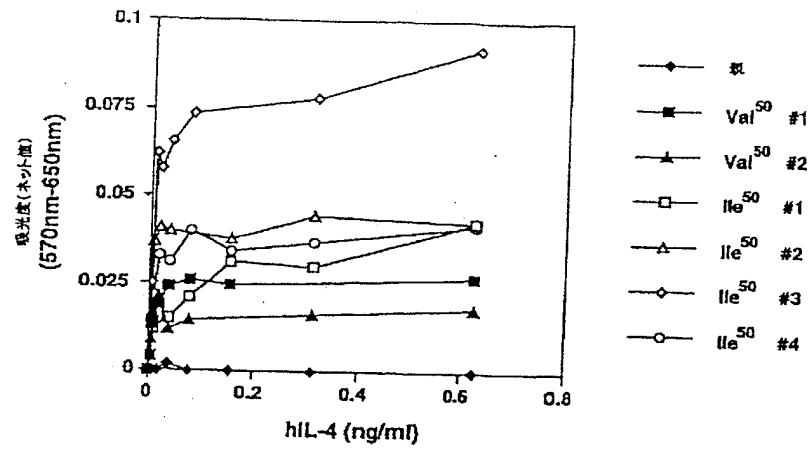
【図6】 Jijoyeトランスフェクタントアッセイ(結合アッセイ)の結果を示す図である。

【図7】 IL-4受容体及びBF-GETP又はJ-GETPによって誘発されたStat6活性を示した図である。図中、矢印はStat6含有DNA複合体の位置を示す。また、図中、AはBF-GETPの結果を示し、BはJ-GETPの結果を示す。

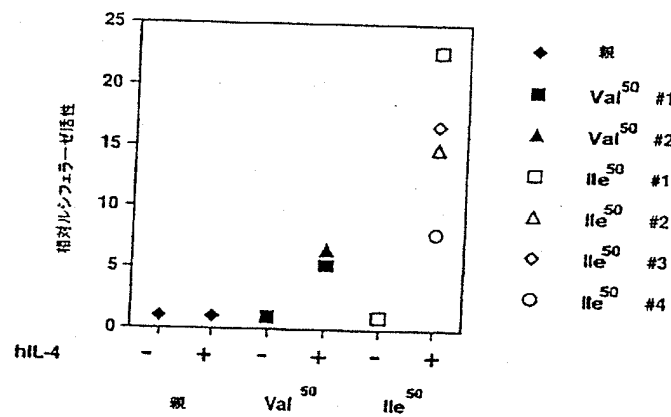
【図1】



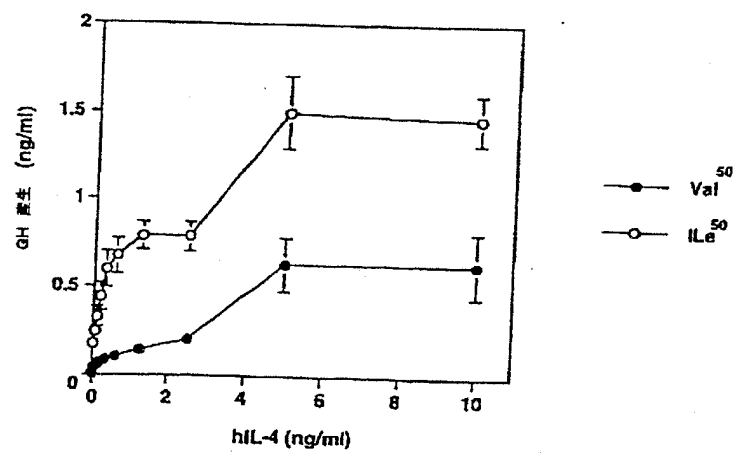
【図2】



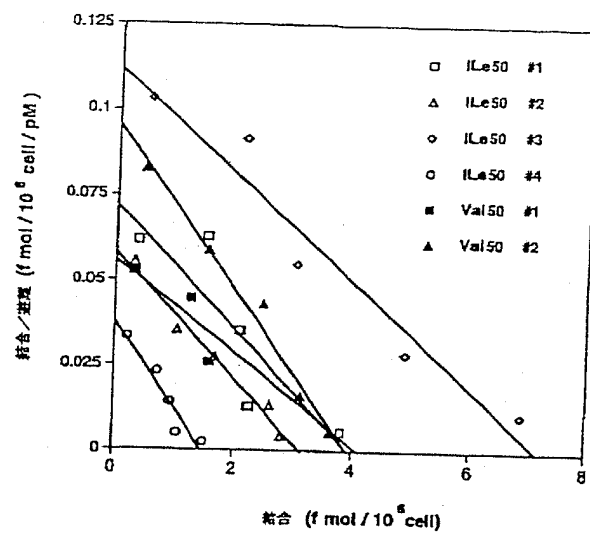
【図3】



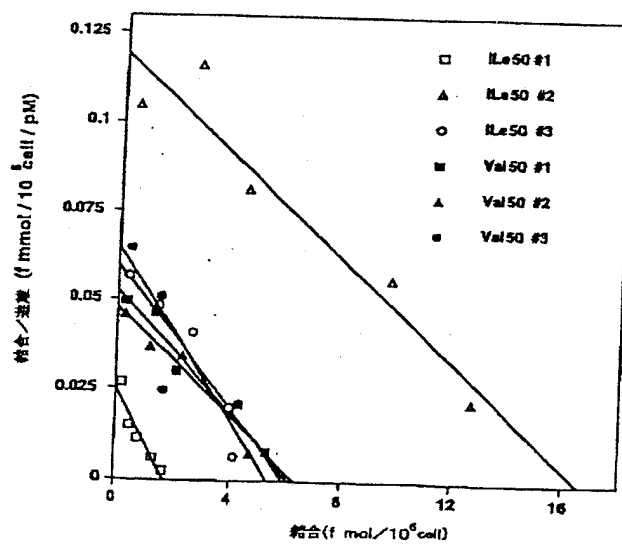
【図5】



【図4】



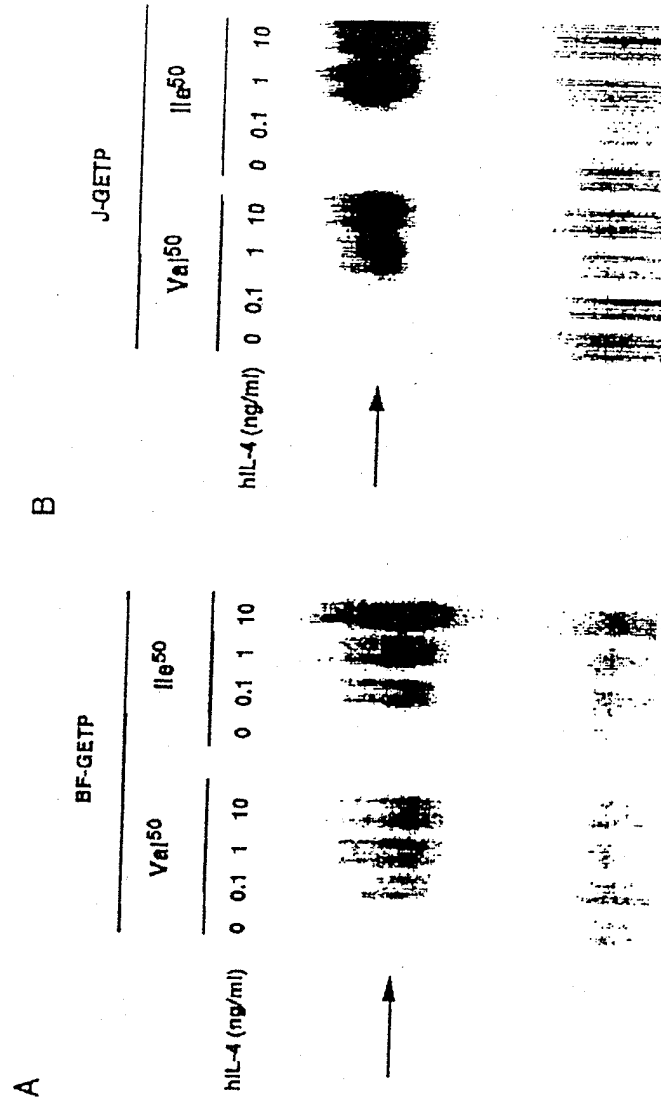
【図6】



(11)

特開平11-332567

【図7】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>6</sup>

G 0 1 N 33/53

識別記号

F I

G 0 1 N 33/53

A 6 1 K 37/02

P